

The analysis of advanced glycation endproducts

Citation for published version (APA):

Scheijen, J. J. L. J. M. (2017). The analysis of advanced glycation endproducts: a mass spectrometry-based approach & its applications. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20170621js>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20170621js](https://doi.org/10.26481/dis.20170621js)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Samenvatting

Hart- en vaatziekten, obesitas en diabetes

Hart- en vaatziekten, obesitas en diabetes kunnen leiden tot gezondheids-problemen of een kortere levensverwachting. Wereldwijd hebben 1,9 miljard mensen overgewicht (hiervan hebben 600 miljoen mensen obesitas) en 422 miljoen mensen diabetes. In 2012 overleden 1,5 miljoen mensen aan de gevolgen van diabetes. In Nederland heeft ongeveer de helft van alle volwassenen overgewicht en leiden er 1 miljoen mensen aan diabetes. Dit aantal zal tot 2025 met 30% toenemen. Kortom, deze aantallen maken duidelijk dat wetenschappelijk onderzoek naar deze ziekten van groot belang is voor mens, maatschappij, gezondheid en economie.

Diabetes, ook wel suikerziekte, is een ziekte waarbij de suikerstofwisseling verstoord is. Via de voeding krijgt ons lichaam koolhydraten binnen in de vorm van suiker, zetmeel en vezels. Deze koolhydraten worden in ons lichaam omgezet naar glucose en worden in de weefsels (o.a. in de spieren) opgenomen en omgezet in energie. Het hormoon insuline, dat aangemaakt wordt in de alvleesklier, reguleert de opname van glucose in de weefsels. Dit mechanisme is verstoord bij mensen met diabetes. Er zijn twee soorten diabetes: type 1 en type 2. Bij type 1 diabetes (T1D) is er sprake van auto-immuundestructie van de β -cellen in de alvleesklier. Hierdoor is er een absoluut tekort aan insuline met als gevolg hoge bloedsuikerwaarden. Patiënten kunnen dan insuline spuiten om de bloedsuikerwaarden te normaliseren, bijvoorbeeld na een maaltijd. Ongeveer 10% van alle patiënten met diabetes heeft T1D. Bij type 2 diabetes (T2D) is er sprake van verminderde gevoeligheid voor insuline. Daarnaast wordt er ook minder insuline aangemaakt waardoor de bloedsuikerwaarde stijgt. Negentig procent van alle patiënten met T2D wordt veroorzaakt door leefstijlfactoren, zoals overgewicht en het gebrek aan fysieke activiteit. Mensen met diabetes hebben een 2 tot 4 keer hoger risico op het krijgen van hart- en vaatziekten ten opzichte van gezonde mensen. In het bijzonder, problemen aan de kleine bloedvaten (ogen, nieren en zenuwen) en aan de grote bloedvaten (hartaanval, beroerte en atherosclerose) zorgen voor dit toegenomen risico. Diabetes zorgt voor een permanente en significante vermindering van de kwaliteit van leven en voor een toename aan de kosten in de gezondheidszorg. Het is daarom van medisch en economisch belang dat diabetes en de daarmee gerelateerde hart- en vaatziekten voorkomen worden.

Diagnose & onderzoek

Vroege indicaties van een verhoogd risico voor hart- en vaatziekten bij patiënten met diabetes, en het toepassen van adequate interventies zal de negatieve gevolgen van deze ziekte sterk doen verlagen.

De enorme impact die hart- en vaatziekten met zich meebrengt dwingt ons tot het zoeken naar geschikte biomarkers, die voorspellend zijn voor hart- en vaatziekten in patiënten met diabetes. Echter, de traditionele cardiovasculaire risicofactoren zijn niet in staat het volledige mechanisme te verklaren. Een beter inzicht in de pathofysiologische routes en uitgebreid onderzoek naar hart- en vaatziekten bij mensen met (pre)diabetes is daarom noodzakelijk.

Advanced glycation endproducts (AGE's)

Versuikering van eiwitten, ook wel glycering genoemd, werd voor het eerst beschreven door de Franse arts en wetenschapper Louis Camille Maillard in 1912. Hij onderzocht de reactie tussen aminozuren en suiker en ontdekte dat deze reactie verantwoordelijk was voor de bruine kleur, specifieke smaak en geur bij de bereiding van voedsel. De naar hem vernoemde Maillard reactie is niet één simpele reactie tussen een aminozuur en suiker, maar een cascade van complexe reacties met uiteindelijk de vorming van advanced glycation endproducts (AGE's).

De vorming van deze AGE's vindt niet alleen plaats bij de bereiding van voedsel maar ook in het menselijk lichaam. Voornamelijk bij patiënten met diabetes, als gevolg van hoge bloedsuikerwaarden, maar ook als gevolg van een verminderde klaring, bij patiënten met chronische nierziekte. AGE's zijn in verband gebracht met diabetische complicaties en hart- en vaatziekten.

In het verleden werden immunochemische analyse technieken (met name enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA's) gebruikt voor het kwantificeren van AGE's. Echter, de kwaliteit en betrouwbaarheid van deze methoden lieten te wensen over. Er moest dus gezocht worden naar gevoeliger en specifiekere technieken. Vloeistofchromatografie was een analysetechniek die al jaren succesvol werd toegepast voor het kwantificeren van biomoleculen. Deze techniek bleek ook uitermate geschikt te zijn voor de analyse van AGE's en andere aanverwante componenten. In dit proefschrift wordt een overzicht gegeven van de ontwikkeling en validatie van een aantal nieuwe chromatografische technieken alsook de toepassing van deze technieken in klinische studies voor de detectie van AGE's en zijn voorlopers.

Belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift

In hoofdstuk 2A wordt een snelle en gevoelige vloeistofchromatografische methode beschreven voor het kwantificeren van pentosidine met fluorescentie als detectiemethode. De belangrijkste verbeteringen van deze nieuwe methode ten opzichte van de al beschreven methoden zijn: kortere runtijden, het gebruik van “reversed-phase” chromatografie in plaats van ingewikkelde chromatografische systemen en een eenvoudige monstervoorbewerking. De beschreven methode werd succesvol toegepast voor het kwantificeren van eiwitgebonden pentosidine in plasma van gezonde vrijwilligers en patiënten met nierfalen. Er werd een significant hogere plasma pentosidine concentratie gevonden in de patiënten met nierfalen ten opzichte van gezonde vrijwilligers. Deze resultaten waren in overeenstemming met de literatuur.

Hoge druk vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie is een analysetechniek die zijn waarde al in vele wetenschappelijke publicaties heeft bewezen. Voornamelijk de introductie en gebruik van zeer kleine partikels ($<1.7\ \mu\text{m}$) bij het pakken van chromatografische kolommen heeft voor een enorme verbetering van de chromatografie gezorgd. De koppeling van deze scheidings-techniek (ultra performace liquid chromatography, UPLC) aan een zeer gevoelige en selectieve massaspectrometer (tandem MS) resulteert in een van de beste analysetechnieken van dit moment.

In hoofdstuk 2B wordt deze techniek toegepast voor de analyse van drie eiwitgebonden en vrije AGE's in plasma, te weten: N^ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML), N^ϵ -(1-carboxyethyl)lysine (CEL) en N^δ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1). Daarnaast was het met dit systeem ook mogelijk het aminozuur lysine te analyseren, dat gebruikt werd als een maat voor de hoeveelheid eiwit. Met deze techniek werd plasma onderzocht van gezonde vrijwilligers en patiënten met nierfalen. Zowel vrij- als eiwitgebonden plasma concentraties van CML, CEL en MG-H1 waren hoger in de patiënten met nierfalen ten opzichte van de gezonde vrijwilligers.

In hoofdstuk 3 werden de technieken, zoals beschreven in hoofdstuk 2A en 2B, gebruikt voor het onderzoeken van de samenhang tussen plasma AGE's en hart- en vaatziekten, in individuen met verschillende gradaties aan glucosetolerantie. Hiervoor werden eiwitgebonden plasma concentraties van CML, CEL en pentosidine gemeten, in twee Nederlandse cohort studies. Verassend genoeg werden er geen verbanden gevonden tussen de eiwitgebonden AGE's en hart- en vaatziekten. Daarnaast bleken eiwitgebonden plasma concentraties van CML, CEL en pentosidine, niet hoger te zijn in mensen met type 2 diabetes. Dit resultaat was in tegenstelling tot de eerder gepubliceerde data in mensen met type 1 diabetes.

Het derivatiseren van biomoleculen wordt vaak gebruikt om de polariteit te veranderen of het molecuul gevoeliger en toepasbaar te maken voor bepaalde detectietechnieken. In hoofdstuk 4 werd een chirale derivatisering, met diacetyl-L-wijsteenzuur-anhydride, toegepast voor het scheiden van L- en D-lactaat met behulp van reversed-phase (RP)

chromatografie gekoppeld aan tandem MS. We waren voornamelijk geïnteresseerd in D-lactaat omdat dit het eindproduct is van het glyoxalase systeem, dat verantwoordelijk is voor de detoxificering van methylglyoxal. Met behulp van deze methode werden concentraties van L- en D-lactaat gekwantificeerd in plasma en urine van gezonde vrijwilligers, patiënten met inflammatoire darmziekten en patiënten met T2D. Plasma en urine L- en D-lactaat concentraties waren significant hoger in patiënten met T2D. In patiënten met inflammatoire darmziekten werd alleen een significant hogere concentratie aan urine L-lactaat gevonden ten opzichte van gezonde vrijwilligers. Deze resultaten bevestigen dat D-lactaat een reflectie is van de detoxificatie van methylglyoxaal door het glyoxalase systeem en niet van de D-lactaat productie in de darmen.

In hoofdstuk 5 werd de samenhang van plasma D-lactaat concentraties met insuline resistentie onderzocht. Hiervoor werd cross-sectioneel onderzoek gedaan in het CODAM cohort (cohort study on diabetes and atherosclerosis Maastricht). Er werd een positieve associatie gevonden tussen plasma D-lactaat en insuline resistentie, onafhankelijk van potentiële confounders. Deze resultaten suggereren dat methylglyoxal een rol speelt in insuline resistentie. Echter, om dit te bevestigen zal verder onderzoek noodzakelijk zijn met specifieke interventies.

In hoofdstuk 4 en 5 werd reeds gespeculeerd over de mogelijke rol van methylglyoxaal bij het ontwikkelen van insuline resistentie. Om deze resultaten te bevestigen en verder te onderzoeken werd in hoofdstuk 6 een nieuwe en verbeterde methode opgezet voor het analyseren van drie α -oxoaldehydes, te weten: glyoxaal, methylglyoxaal en 3-deoxyglucosone. Daarnaast werd een uitgebreide validatie van de methode en monstervoorbewerking uitgevoerd. Om stabiele en betrouwbare concentraties van deze α -oxoaldehydes te verkrijgen vonden we dat het bloed afgenomen dient te worden in EDTA buizen en een directe onteiwiting met perchloorzuur noodzakelijk is om de α -oxoaldehyde concentraties te stabiliseren. Met de beschreven methode werden verhoogde plasma α -oxoaldehyde concentraties gevonden in patiënten met T2D ten opzichte van gezonde controles.

S

In hoofdstuk 7 werd de invloed van een orale glucose belasting op plasma α -oxoaldehyde concentraties onderzocht. Hiervoor werd cross-sectioneel onderzoek gedaan in het CODAM cohort. Plasma concentraties van glyoxaal, methylglyoxaal en 3-deoxyglucosone werden gemeten in de nuchtere toestand en na een orale glucose tolerantie test (OGTT). Het hebben van prediabetes en type 2 diabetes was geassocieerd met hogere plasma α -oxoaldehyde concentraties gedurende de OGTT. Deze resultaten tonen aan dat er een stijging is van dicarbonyl stress in voornamelijk patiënten met (pre)diabetes na het nuttigen van glucose-houdende dranken.

Deze verhoogde productie heeft mogelijk ook consequenties voor de vorming van AGE's. Echter, de endogene vorming van AGE's is veel minder snel dan de vorming van α -oxoaldehydes en zal daardoor waarschijnlijk geen acuut effect laten zien.

In de inleiding werd beschreven dat AGE's aanwezig zijn in voedsel, voornamelijk bij de bereiding (bakken, grillen en frituren) van voedsel worden deze AGE's gevormd. Mogelijk leveren deze in voeding aanwezige AGE's, wel een directe bijdrage op de concentratie van circulerende AGE's in plasma. Om dit te onderzoeken dient men inzicht te krijgen in de hoeveelheid AGE's per voedingsproduct. In hoofdstuk 8 werd daarom een UPLC-tandem MS methode ontwikkeld voor het analyseren van AGE's in voedingsproducten geconsumeerd in een westers dieet. Eiwitgebonden CML, CEL en MG-H1 concentraties werden in 190 verschillende voedingsproducten gekwantificeerd. Fruit, groente, boter en koffie waren producten met een lage of verwaarloosbare AGE concentratie. Hoge AGE concentraties werden gevonden in gebakken, gefrituurde en gegrilde producten, zoals vlees, pindaas, frikadel en noten.

In hoofdstuk 9 werd de voedings-AGE-database, zoals beschreven in hoofdstuk 8, gebruikt om de associatie tussen ingenomen AGE's (via de voeding) en circulerende AGE's te onderzoeken. Plasma en urine concentraties van CML, CEL en MG-H1 werden geanalyseerd in 465 individuen van het CODAM cohort. Daarnaast werd de AGE-inname geschat aan de hand van een voedingsvragenlijst en de AGE-database. De conclusie van dit onderzoek was, dat het eten van voedsel rijk aan AGE's geassocieerd is met de concentraties van vrije AGE's, zoals gemeten in plasma en urine. Deze resultaten duiden op de mogelijke consequenties van het eten van een dieet rijk aan AGE's.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft de toepassing van nieuwe analysetechnieken voor het onderzoeken van AGE's en zijn voorlopers in diverse matrices. De belangrijkste conclusie van dit proefschrift is dat vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie een waardevolle en zeer betrouwbare methode is voor het analyseren van biomoleculen in complexe matrices. Met deze techniek werd aangetoond dat AGE's en zijn voorlopers nauw verband houden met verschillende ziekten, zoals diabetes, nierziekte, hart- en vaatziekten en inflammatoire darmziekte. Echter, het causale verband tussen AGE's en deze ziekten zal nog verder onderzocht moeten worden. Hiervoor zullen specifieke interventiestudies noodzakelijk zijn, waarbij gekeken wordt naar het remmen van AGE's of verlaging van AGE's vanuit de voeding en de invloed hiervan op bijvoorbeeld insuline resistentie of het ontwikkelen van hart- en vaatziekten. De toepassing van de technieken, beschreven in dit proefschrift, zullen een noodzakelijke rol spelen in dit vervolgonderzoek. Daarnaast staan de ontwikkeling van nieuwe technieken voor het analyseren van andere AGE's en biomoleculen niet stil. De zoektocht naar geschikte biomarkers, voor het voorspellen van ziekten en complicaties en daarmee de behandelingsstrategie te verbeteren, zal de inzet zijn van toekomstig onderzoek.